丛枝菌根真菌和根瘤菌对白三叶氮同化的影响

吴会会[1]，刘瑞成[1]，江道菊[2]，谢苗苗[1]，邹英宁[1*]

（ 1.长江大学 园艺园林学院，湖北 荆州 434025；2. 荆州市自然资源和规划局沙市区分局，湖北 荆州 434000 ）

摘　要：为揭示丛枝菌根真菌（AMF）和根瘤菌在白三叶氮（N）同化中的作用，对白三叶进行单一或者联合接种隐类球囊霉（*Paraglomus occultum*）和三叶草根瘤菌（*Rhizobium trifolii*），分析其对生长、光合作用、叶片 N 和氨基酸含量以及 N 同化相关酶活性的影响。结果表明：（1）单一接种 AMF 或根瘤菌以及联合接种 AMF 和根瘤菌均显著增加了白三叶的株高、匍匐茎长度、叶片数、地上部生物量、总生物量、叶绿素 b 和总叶绿素含量、稳态光量子效率和叶片 N 含量，这种增强效应是联合接种>单一 AMF>单一根瘤菌>未接种处理。（2）联合接种 AMF 和根瘤菌还显著增加了白三叶叶片中丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸和组氨酸的含量，同时显著提升了叶片 N 同化相关酶如硝酸还原酶、亚硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶、谷氨酸合成酶、谷氨酸脱氢酶、天冬酰胺合成酶和天冬氨酸转氨酶的活性，且显著促进 AMF 对白三叶根系的侵染。该研究表明了联合接种 AMF 和根瘤菌通过激活 N 同化相关酶活性有效促进 N 同化，产生更多的氨基酸，进一步促进白三叶植株的生长。文章表明 AMF 和根瘤菌具有协同作用，有效促进了白三叶的 N 同化。

关键词：丛枝菌根真菌，根瘤菌，白三叶，氮（N）同化，氨基酸

中图分类号：Q946　　　　**文献标识码：**A　　　　**文章编号：**

Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on nitrogen assimilation of white clover

WU Huihui[1], LIU Ruicheng[1], JIANG Daoju[2], XIE Miaomiao[1], ZOU Yingning[1*]

(1. *College of Horticulture and Gardening, Yangtze University*, Jingzhou 434025, Hubei, China; 2. *Shashi Substation, Jingzhou Municipal Bureau of Natural Resources and Planning*, Jingzhou 434000, Hubei , China)

Abstract: Symbiotic microorganisms such as arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and rhizobia both promote host plant N acquisition, but whether and how the combination affects host plant nitrogen (N) assimilation remains unclear. To clarify the role of AMF and rhizobia on N assimilation in white clover (*Trifolium repens*), the effect of single or combined inoculation with an arbuscular mycorrhizal fungus

基金项目：湖北省农业科技创新行动项目（鄂农发[2018]1 号）。
第一作者：吴会会（1984-），博士，主要从事植物菌根生理研究，(E-mail)360148224@qq.com。
***通信作者：**邹英宁，教授，主要从事植物菌根生物技术研究，(E-mail)zouyingning@163.com。

Paraglomus occultum and a rhizobium *Rhizobium trifolii* on plant growth, photosynthesis, leaf N and amino acid contents, and the activities of N assimilation-related enzymes were analyzed in white clover (*Trifolium repens* L.) under potted conditions. The results obtained were as follows: (1) The plant height, stolon length, leaf number, shoot biomass, total biomass, chlorophyll b and total chlorothyll contents, steady-state light quantum efficiency, and leaf N contents of white clover were significantly increased by single inoculation with *P. occultum*, single *R. trifolii*, and combined inoculations of *P. occultum* and *R. trifolii*, along with the order of combined inoculations of *P. occultum* and *R. trifolii* > single *P. occultum* > single *R. trifolii* > non-inoculation control. (2) Combined inoculations of *P. occultum* and *R. trifolii* significantly increased the contents of various amino acids including alanine, arginine, asparagine, aspartate, glutamine, glutamic acid and histidine in leaves of white clover, and distinctly improved the activities of nitroreductase, nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthetase, glutamate dehydrogenase, asparagine synthetase, and aspartate aminotransferase. In addition, the introduction of *R. trifolii* significantly promoted the colonization of *P. occultum* to roots of white clover, suggesting the partnership between the two. Therefore, it is concluded that combined inoculations of AMF and rhizobia promote N assimilation, generate more amino acids, and further promote the growth of white clover by activating the activities of N assimilation-related enzymes. It is further demonstrated that AMF and rhizobia have synergistic effects on promoting N assimilation of white clover.

Key words: arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), rhizobia, white clover, nitrogen (N) assimilation, amino acids

从枝菌根真菌（arbuscular mycorrhizal fungi，AMF）是土壤中广泛存在的有益真菌，与植物共生后在根系表面形成根外菌丝，促进植物对氮（nitrogen, N）、磷（phosphorus, P）等元素的吸收。AMF 帮助宿主植物吸收土壤中不同形态的 N 素，铵态氮（NH_4^+）是 AMF 根外菌丝主要的吸收形式（Xie et al., 2022）。AMF 还增加宿主植物游离氨基酸等氮源的积累，其菌丝对植物 N 的贡献率可达 74%（张良和杨春雪，2018）。因此，AMF 对宿主植物 N 的吸收至关重要。根瘤菌（rhizobia）是土壤中常见的革兰氏阴性细菌，在豆科作物根毛中定殖形成根瘤，从而建立共生体系，进行生物固氮，帮助植物 N 的获取（Masson-boivin & Sachs, 2018）。研究表明，与单一接种相比，联合接种 AMF 和根瘤菌更能促进豆科作物生物固氮，增强 N 的水平，同时提高土壤铀清除率，呈现出更强的植物修复效率（Ren et al., 2019）。然而，也有研究表明，AMF 和根瘤菌联合接种甚至抑制了豌豆和绿豆对 N 的吸收（Saxena et al., 1997; Blilou et al., 1999）。不一致的结果揭示了 AMF 和根瘤菌联合接种对宿主 N 的吸收是非常复杂的，尚需要进一步研究，特别是两者结合是否能够促进豆科作物如白三叶（*Trifolium repens* L.）的 N 同化，目前还不清楚。

植株从土壤中获取的主要是硝态氮（NO_3^-）和 NH_4^+等无机氮，只有将这些无机氮同化成如氨基酸、蛋白质等有机氮后才能为植物所利用，而同化过程则需要多种酶的参与。植物吸收的 NO_3^-在硝酸还原酶（NR）作用下被还原成亚硝态氮（NO_2^-），然后在亚硝酸还原酶（NiR）作用下转化为 NH_4^+（Serralta et al., 2020）。NH_4^+在谷氨酰胺合成酶（GS）和 ATP 的共同作用下，生成谷氨酰胺（Gln），再通过谷氨酸合成酶（GOGAT）催化成谷氨酸（Glu）。通过 GS/GOGAT 途径同化生成有机氮，此途径同化植株内 NH_4^+量达 95%（Hirel & Gadal, 1980）。谷氨酸脱氢酶（GDH）是 GS/GOGAT 途径的补充途径，当植株中 NH_4^+浓度过高时，才进行作用，催化合成 Glu（Hodges, 2002）。天冬氨酸转氨酶（AST）和丙氨酸转氨酶（ALT）则是将 GS/GOGAT 途径形成的 Glu 转化成天冬氨酸（Asp）和丙氨酸（Ala）。天冬酰胺（Asn）是植株韧皮部运输的主要有机 N 形式之一，其合成受天冬酰胺合成酶（AS）的影响（薛迎斌，2018）。目前还不清楚 AMF 和根瘤菌联合接种对宿主 N 同化产物水平是否产生影响。

白三叶作为多年生豆科牧草，对根瘤菌和 AMF 有良好的亲和性，具有匍匐生长、扩张能力强、再生速度快和具有较高的粗蛋白含量等特点，是绿地建设的主要草种，也是廉价优质的牧草（赵桂琴等，2004）。本试验的目的是通过研究单一或联合接种 AMF 和根瘤菌对白三叶生长、光合作用、N 含量、氨基酸组份及 N 同化相关酶活性的变化，分析 AMF 和根瘤菌对白三叶 N 同化的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

白三叶种子购于湖北省种子站。根据 Xie 等（2020）前期的试验结果，选用 AMF 菌种为隐类球囊霉 *Paraglomus occultum*，由中国丛枝菌根真菌种质资源库（BGC）提供，然后由长江大学根系生物学研究所经白三叶盆栽扩繁 3 个月后，通过孢子密度测定，确定每 g AMF 菌种内含 20 个孢子。供试白三叶根瘤菌 *Rhizobium trifolii* 由中国农业微生物菌种保藏管理中心提供，经酵母甘露醇液体培养基活化、单菌落培养。挑取单菌落于 40 mL 液体培养基中，在 220 $r \cdot min^{-1}$、28 ℃ 下培养 18 h。取 1 mL 菌液置 20 mL 液体培养基，在 220 $r \cdot min^{-1}$、28 ℃ 下继续培养 3 h，随后 8 000 ×*g* 离心 2 min，弃上清液，用无菌水制菌悬液至浓度为 4.27×10^8 $CFU \cdot mL^{-1}$（OD_{600} 为 0.3）。

栽培基质为土和沙，比例为 3/1（V/V），经过高温灭菌（0.11 MPa，121 ℃，2 h）使沙和土中的土著真菌孢子失活。试验用土采自长江大学落叶果树基地，试验用沙为直径< 4 mm 的河沙。试验用塑料盆的规格为上口径 15 cm，下口径 10 cm，高 12 cm，装 1.3 kg 基质。

1.2 试验设计

本试验共设 4 处理，分别为：未接种对照（Control）、接种根瘤菌（Inoculation with Rh）、接种 AMF（Inoculation with AMF）、联合接种 AMF 和根瘤菌（Inoculation with AMF and Rh）。每个处理有 8 个重复，随机排列，共 32 盆。

1.3 植物培养

白三叶播种前，首先用 95%乙醇和 0.525%次氯酸钠分别对种子进行表面消毒 5 min，无菌水清洗 5 次。然后按照 30 粒种子/盆，播种在装有栽培基质的塑料盆中，3 周（w）后间苗至 12 棵/盆。播种的时候进行接种处理，其中单接种根瘤菌处理是每盆接种 10 mL *R. trifolii* 菌悬液，且所播种子预先在 *R. trifolii* 菌悬液浸泡 30 min；单接种 AMF 处理是将 100 g *P. occultum* 菌种混于栽培基质中；联合接种 AMF 和根瘤菌处理是将 100 g *P. occultum* 菌种混于栽培基质，且所播种子预先在 *R. trifolii* 菌悬液浸泡 30 min，然后将 10 mL *R. trifolii* 菌悬液也接种到栽培基质中；未接种对照（Control）是混入等量灭菌的 *P. occultum* 菌种和 *R. trifolii* 菌悬液，并且种子同样浸泡在灭菌后的 *R. trifolii* 菌悬液中 30 min。处理后的植物生长在一个环境可控的生长室内培养，光照强度为 900 Lux，温度为 28 ℃/23 ℃（白天/黑夜），空气相对湿度为 68%。定期更换塑料盆位置以避免环境差异影响试验结果。植物培养期间未添加其他养分，每日 17:00 浇水 100 mL，培养 12 w 后结束试验。

1.4 植株生长及生理指标测定

收获时植株分成地上部与地下部，人工测定生长指标，植株株高、叶片数、匍匐茎长度和生物量。采用 FluorCam 叶绿素荧光成像仪进行活体测定叶绿素荧光参数。

根系菌根真菌侵染采取 Phillips 和 Hayman（1970）的方法测定，菌根真菌侵染率为 AMF 侵染的根段长度与观察的总根段长度的百分比。

叶绿素含量采用王学奎（2016）描述的方法进行。

叶片 N 含量测定将叶片消化后采用间断化学分析仪（Autochem 1200）分析。叶片氨基酸组份经过乙腈水超声提取、离心和微孔滤膜过滤（Liyanaarachichi et al., 2018），然后在高效液相色谱-质谱联用（Shimadzu LC-20ADXR 和 Applied Biosystems Sciex Q-trap 5500 质谱仪）上分析。

叶片硝酸还原酶活性采用磺胺比色法（Cervilla et al., 2009）测定。亚硝酸还原酶活性参照 Ogawa 等（1999）方法进行。谷氨酸合成酶依据 Singh 和 Srivastava（1986）描述的方法进行。采用刘淑云等（2007）方法测定谷氨酸脱氢酶活性。天冬酰胺合成酶活性参照 Shifrin 等（1974）方法测定。丙氨酸转氨酶和天冬氨酸转氨酶活性依据梁成刚等（2013）描述的方法进行。谷氨酰胺合成酶测定参照 Husted 等（2002）方法稍作修改，具体如下：称取 0.2 g 新鲜样品，加入 3 mL 50 mmol·L^{-1} Tris-HCl 缓冲液（0.1 mol·L^{-1} Tris、2 mmol·L^{-1} $MgSO_4$、2 mmol·L^{-1} 二硫苏糖醇和 40 mmol·L^{-1} 蔗糖）研磨成浆，4 ℃ 下 10 000 ×*g* 离心 15 min。取 0.7 mL 上清液，加入 1.6 mL 反应液（80 mmol·L^{-1} $MgSO_4$、20 mmol·L^{-1} L-Na-谷氨酸盐和 20 mmol·L^{-1} L-半胱氨酸）以及 0.7 mL ATP 溶液，混匀后置 37℃ 保温 30 min，再加入 1 mL 显色剂（0.2 mol·L^{-1} 三氯乙酸、0.37 mol·L^{-1} $FeCl_3$ 和 0.6 mol·L^{-1} HCl），摇匀，显色 10 min 后，于 5 000 ×*g* 离心 10 min 后取其上清液，在 540 nm 下测定吸光值。

1.5 统计分析

使用 SAS®软件（9.1.3v）（SAS Institute Inc., Cary, NC, USA）进行方差分析，多重比较采用邓肯新复极差法。

2 结果与分析

2.1 单一或联合接种 AMF 和根瘤菌对 AMF 侵染白三叶根系的影响

未接种 AMF 的植株根系未发现菌根真菌侵染，而接种 AMF 的植株根系可见菌根结构（图 1），其中单接种 AMF 的白三叶菌根真菌侵染率为（77.9±7.9）%，联合接种 AMF 和根瘤菌的植株根系菌根真菌侵染率为（92.8±5.8）%，表明接种根瘤菌促进了 AMF 对白三叶根系的侵染。

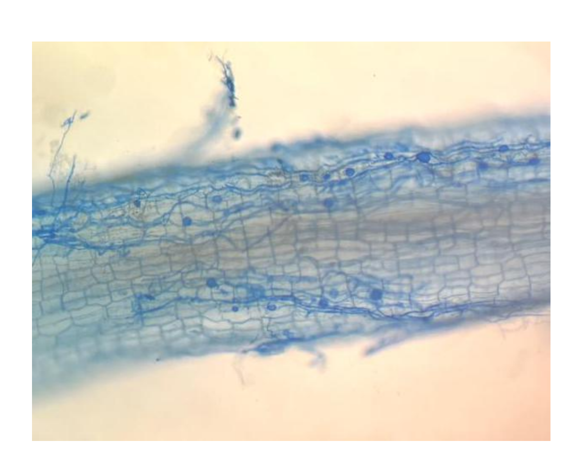


图 1　AMF 对白三叶草根系的侵染

Fig. 1 Root colonization of white clover by AMF

2.2 单一或联合接种 AMF 和根瘤菌对白三叶生长的影响

接种处理都促进了白三叶的生长（如表 1）。与不接种对照相比，单接种根瘤菌显著提高了株高、匍匐茎长度、叶片数、地上部生物量以及总生物量，分别提高了 9.3%、49.4%、14.5%、19.9%和 18.2%，对地下部生物量无显著影响；单接种 AMF 与联合接种 AMF 和根瘤菌均显著提高了白三叶的株高、匍匐茎长度、叶片数、地上部生物量、地下部生物量和总生物量，分别提高了 12.1%、48.7%、34.7%、32.9%、22.6%和 31.0%，22.5%、202.6%、54.9%、74.1%、30.2%和 66.3%。此外，联合接种对植株生长的促进作用明显优于单接种，单接种 AMF 对植株生长的促进效果在叶片数和生物量上要优于单接种根瘤菌。

表 1　单一或联合接种 AMF 和根瘤菌对白三叶生长的影响

Table 1 Effects of single or combined inoculation with AMF and rhizobia on growth of white clover

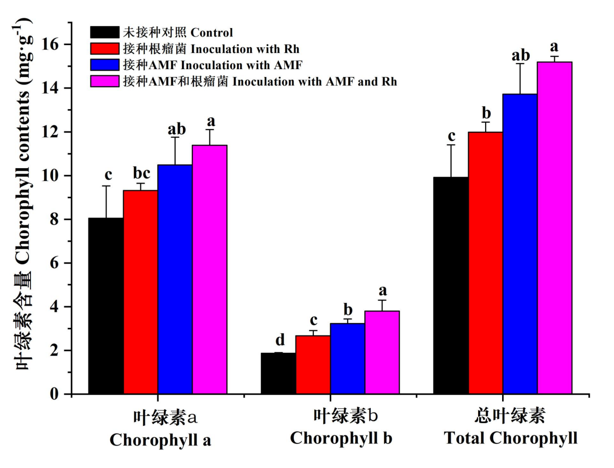
处理 Treatment	株高 Plant height (cm)	匍匐茎长度 Stolon length (cm)	叶片数 Leaf number	生物量 Biomass (g，FW)		
				地上部 Shoot	地下部 Root	总 Total
未接种对照 Control	22.75±2.05c	2.15±0.56c	11±1d	2.18±0.19d	0.48±0.08c	2.66±0.19d
接种根瘤菌 Inoculation with Rh	24.88±1.55b	3.21±0.31b	12±1c	2.62±0.22c	0.53±0.05bc	3.15±0.22c
接种 AMF Inoculation with AMF	25.50±2.20b	3.19±0.31b	14±1b	2.90±0.24b	0.58±0.04ab	3.49±0.27b
接种 AMF 和根瘤菌 Inoculation with AMF and Rh	27.88±2.10a	6.50±0.48a	16±2a	3.80±0.32a	0.62±0.05a	4.42±0.32a

注：同一列数字后的不同字母表示差异显著（$P < 0.05$）。缩写：Rh. 根瘤菌；AMF. 丛枝菌根真菌。

Notes: Different letters following the same column of numbers mean significant difference ($P < 0.05$). Abbreviation: Rh. rhizobia; AMF. arbuscular mycorrhizal fungi.

2.3 单一或联合接种 AMF 和根瘤菌对白三叶叶绿素含量的影响

如图 2 所示，与不接种处理相比，单接种根瘤菌处理显著提高了叶绿素 b 和总叶绿素含量，分别提高了 42.5%和 20.8%，而对叶绿素 a 无显著影响。单接种 AMF 与联合接种 AMF 和根瘤菌均显著提高了叶绿素 a、b 和总叶绿素含量，分别提高了 30.4%、72.6%、38.3%和 41.6%、102.6%、53.1%。此外，联合接种对叶绿素含量的促进效应明显优于单接种根瘤菌或 AMF。



不同字母表示处理间差异显著（$P < 0.05$）。**Rh**. 根瘤菌；**AMF**. 丛枝菌根真菌。下同。

Different letters among treatments indicate significant differences ($P < 0.05$). **Rh**. Rhizobia; **AMF**. arbuscular mycorrhizal fungi. The same below.

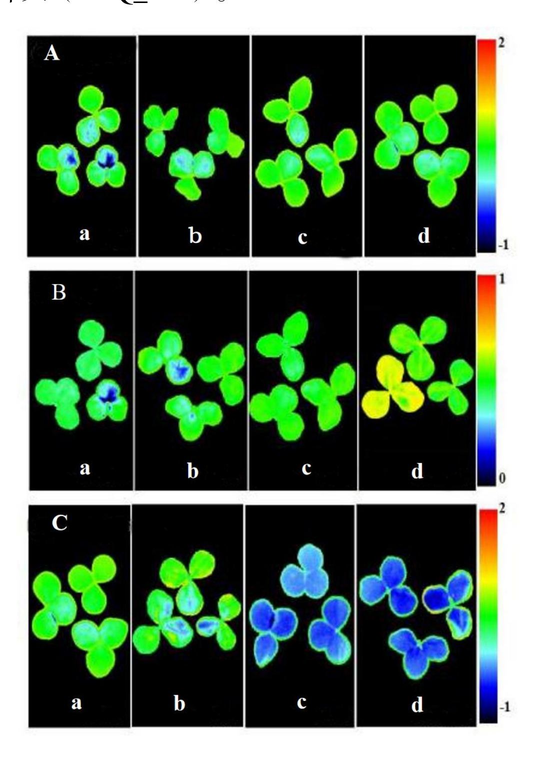
图 2 单一或联合接种 AMF 和根瘤菌对白三叶叶绿素 a、b 和总叶绿素含量的影响

Fig. 2 Effects of single or combined inoculation with AMF and rhizobia on leaf chorophyll a, b, and total contents of white clover

2.4 单一或联合接种 AMF 和根瘤菌对白三叶叶绿素荧光参数的影响

由图 3A-C 显示：与不接种对照相比，单接种 AMF 或根瘤菌对叶片最大光量子效率（QY_max）均无显著影响，而联合接种 AMF 和根瘤菌的处理中 QY_max 显著提高了 31.4%。单接种根瘤菌、单接种 AMF 与联合接种 AMF 和根瘤菌均显著提高了叶片稳态光量子效率（QY_Lss），显著降

低了叶片稳态非光化荧光淬灭（NPQ_Lss）。



A. 最大光量子效率；**B**. 稳态光量子效率；**C**. 稳态非光化荧光淬灭；**a**. 未接种对照；**b**. 接种根瘤菌；**c**. 接种AMF；**d**. 接种 AMF 和根瘤菌。

A. QY_max; **B**. QY_less; **C**. NPQ_Less; **a**. Control; **b**. Inoculation with Rh; **c**. Inoculation with AMF; **d**. Inoculation with AMF and Rh.

图 3 单一或联合接种 AMF 和根瘤菌对白三叶叶绿素荧光参数的影响

Fig. 3 Effects of single or combined inoculation with AMF and rhizobia on leaf chlorophyll fluorescence parameters of white clover

2.5 单一或联合接种 AMF 和根瘤菌对白三叶叶片 N 含量的影响

与不接种相比，单接种根瘤菌、单接种 AMF 以及联合接种 AMF 和根瘤菌的白三叶叶片 N 含量分别显著提高了 9.6%、18.8%和 30.3%（图 4）。联合接种对叶片 N 含量的增强效果要显著高于单一接种根瘤菌或 AMF。

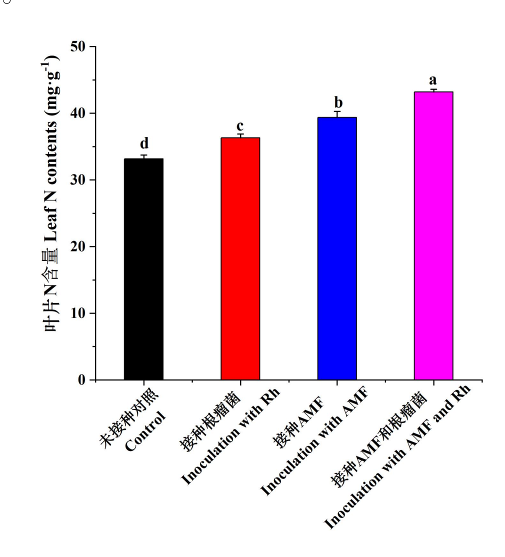


图 4 单一或联合接种 AMF 和根瘤菌对白三叶叶片 N 含量的影响
Fig. 4 Effects of single or combined inoculation with AMF and rhizobia on leaf N contents of white clover

2.6 单一或联合接种 AMF 和根瘤菌对白三叶叶片氨基酸含量的影响

与未接种相比，单接种根瘤菌显著提高了叶片 Ala 和 Gln 含量，分别提高了 27.5%和 38.8%，显著降低了 Orn 含量，降低了 48.3%，对 Arg、Asn、Asp、Glu 和 His 含量无显著影响；单接种 AMF 以及联合接种 AMF 和根瘤菌均显著提高了白三叶叶片 Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu 和 His 含量，分别提高了 80.8%、104.5%、115.4%、34.1 %、99.5%、64.7%和 103.1%，98.9%、227.0%、114.4%、56.8%、101.4%、45.5%和 154.7%，均显著降低了 Orn 含量，分别降低了 28.6%及 39.5%（表 2）。联合接种 AMF 和根瘤菌对白三叶叶片氨基酸的含量的促进效果更显著。

表 2 单一或联合接种 AMF 和根瘤菌对白三叶叶片氨基酸含量的影响（单位：$\mu g.g^{-1}$）
Table 2 Effects of single or combined inoculation with AMF and rhizobia on leaf amino acid contents of white clover（unit:$\mu g.g^{-1}$）

氨基酸 Amino acids	未接种对照 Control	接种根瘤菌 Inoculation with Rh	接种 AMF Inoculation with AMF	接种 AMF 和根瘤菌 Inoculation with AMF and Rh
丙氨酸 Ala	41.92±1.94d	53.45±1.03c	75.81±0.89b	83.40±1.00a
精氨酸 Arg	22.37±1.55c	25.91±2.34c	45.74±2.87b	73.14±1.84a
天冬酰胺 Asn	454.65±21.58b	692.03±14.80b	979.30±30.34a	974.77±2.15a
天冬氨酸 Asp	145.73±5.46c	149.61±7.54c	195.45±2.69b	228.56±8.65a
谷氨酰胺 Gln	33.34±0.43c	46.29±1.91b	66.52±2.07a	67.15±0.59a
谷氨酸 Glu	318.74±8.92c	326.95±5.35c	525.16±19.12a	463.92±8.62b
组氨酸 His	9.03±0.71c	10.70±1.15c	18.34±0.63b	23.00±3.67a
鸟氨酸 Orn	2.38±0.08a	1.23±0.01d	1.70±0.04b	1.44±0.04c

注：同一行数字后的不同字母表示差异显著（$P < 0.05$）。缩写：Rh. 根瘤菌；AMF. 丛枝菌根真菌。下同。
Notes: Different letters following the same line of numbers mean significant difference ($P < 0.05$). Abbreviation: Rh. rhizobia; AMF. arbuscular mycorrhizal fungi. The same below.

2.7 单一或联合接种 AMF 和根瘤菌对白三叶叶片 N 同化相关酶活性的影响

与未接种处理相比，单接种根瘤菌显著提高了叶片 GS、GOGAT、GDH、AS 和 AST 活性，分别提高 25.0%、13.6%、25.5%、26.9%和 36.0%；单接种 AMF 显著提高了叶片 NR、NiR、GOGAT、GDH、AS 和 AST 活性，分别提高了 29.3%、33.6%、33.7%、26.0%、44.1%和 36.8%；联合接种 AMF 和根瘤菌处理显著提高了叶片 NR、NiR、GS、GOGAT、GDH、AS 和 AST 活性，分别提高了 64.3%、85.5%、39.8%、58.1%、51.7%、68.2%和 57.1%（表 3）。联合接种对 N 同化相关酶活性的提升效果明显高于单一接种。

表 3 单一或联合接种 AMF 和根瘤菌对白三叶叶片 N 同化相关酶活性的影响
Table 3 Effects of single or combined inoculation with AMF and rhizobia on the activities of leaf N assimilation-related enzymes of white clover

N 同化相关酶活性 The activities of N assimilation-related enzymes	未接种对照 Control	接种根瘤菌 Inoculation with Rh	接种 AMF Inoculation with AMF	接种 AMF 和根瘤菌 Inoculation with AMF and Rh

硝酸还原酶 NR ($\mu g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ FW)	12.89±0.52c	13.56±0.53c	16.67±1.00b	21.19±0.38a
亚硝酸还原酶 NiR ($\mu g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ FW)	16.21±0.62c	17.25±0.67c	21.66±1.13b	30.07±0.61a
谷氨酰胺合成酶 GS ($A \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ FW)	9.79±0.86b	12.24±0.73a	9.24±0.93b	13.69±1.13a
谷氨酸合成酶 GOGAT ($\mu mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ FW)	61.80±0.84d	70.22±0.77c	82.65±1.87b	97.73±1.82a
谷氨酸脱氢酶 GDH ($\mu mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ FW)	12.29±0.33c	15.42±0.12b	15.48±0.20b	18.65±0.42a
天冬酰胺合成酶 AS ($\mu mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ FW)	220.86±4.95d	280.17±6.12c	318.21±8.35b	371.53±2.38a
天冬氨酸转氨酶 AST ($\mu mol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$ FW)	8.25±0.20c	11.22±0.34b	11.29±0.16b	12.96±0.11a
丙氨酸转氨酶 ALT ($\mu mol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$ FW)	3.70±0.02ab	3.62±0.93b	4.11±0.15ab	4.59±0.04a

3 讨论与结论

3.1 讨论

本研究中根瘤菌的接种显著促进了 AMF 对白三叶根系侵染，表明根瘤菌的引入有利于根系丛枝菌根的形成，其原因是根瘤菌通过固氮满足 AMF 对 N 的需求，有利于根系 AMF 的建立（Xavier & Germida, 2003）。此外，根瘤菌提高了豆科植物体内的 N 水平，但为了维持体内 N 和 P 的平衡，豆科植物的固 N 效率很大程度上取决于 P 的供应，而 AMF 有利于促进植株对 P 的吸收。因此，豆科植物会提供给 AMF 足够多的 C 供应，促进根系菌根的形成（Liu et al., 2020），进而有利于 P 的吸收。

在本研究中，联合接种 AMF 和根瘤菌对白三叶生长的促进效果要显著高于单一接种，表明 AMF 和根瘤菌产生了协同效应共同促进植物生长，这与 Talaat 和 Abdallah（2008）在蚕豆上的研究结果一致。根瘤菌和 AMF 对白三叶生长的协同作用原因是根瘤菌的引入不仅促进了植株的固 N 的效率及固 N 总量，而且促进了白三叶根系中 AMF 的侵染率，促使白三叶植株根系和 AMF 的生长更好，进一步扩大了植株根系和根外菌丝对水分和养分的吸收面积。

本研究显示单一接种 AMF 和根瘤菌均显著增加叶绿素 b 以及总叶绿素含量，且联合接种 AMF 和根瘤菌进一步增强了这种效应。此外，联合接种的白三叶植株的 QY_max 和 QY_Lss 参数显著高于未接种植株，而 NPQ_Lss 参数显著低于未接种植株。QY_max 和 QY_Lss 是光合性能的敏感指标，NPQ_Lss 是过多的激发能以热能形式散发的参数（黄小辉等，2022）。联合接种 AMF 和根瘤菌，一方面提高植株叶片光能转化的效率以及反应中心电子传递活性，同时也抑制植株光能以热量散失，从而保障白三叶植株光合产物最大效率地积累。因此，联合接种 AMF 和根瘤菌的植株拥有较高的光合能力，而植株积累大量的光合产物也为植物根系、AMF 和根瘤菌生长提供保障。

本研究结果还表明，单接种根瘤菌或 AMF 均显著增加白三叶叶片 N 含量，而联合接种植株叶片的 N 含量要显著高于单接种。事实上，豆科植物的固 N 效率与 P 的供应密切相关，且 P 是根瘤菌固 N 反应所需 ATP 酶合成的重要元素，并且豆科植物根瘤的形成也需要 P，而 AMF 庞

大的根外菌丝结构有利于 P 的获取。因此 AMF 在根瘤菌与植株建立友好共生过程中提供根瘤形成所需的 P，共同提高植株共生固氮水平（Xie et al., 2022）。Arg 是 AMF 菌丝中氨基酸运输的主要类型，其含量占菌丝氨基酸总量的 90%（金海如，2008），因此 Arg 对菌根 N 的转移起重要作用。本研究证实了接种 AMF 显著提高了 Arg 含量。Arg 还是生成信使分子如多胺的前体，进而可以促进细胞分裂（杨洪强和高华军，2007）。联合接种植株中的 Arg 含量显著高于单接种和未接种植株，这与刁亚南等（2014）在绿豆上接种 AM 真菌和根瘤菌的结果一致。表明 AMF 和根瘤菌的协同作用显著增加了 Arg，共同促进植株地上部细胞分裂，进一步促进植株生长。Asn 是根瘤向共生植株输送 N 化合物的主要形式（薛迎斌，2018），所以单接种根瘤菌比单接种 AMF 更加显著提高 Asn 含量。而联合接种 AMF 和根瘤处理具有协同作用，显著提高了白三叶叶片氨基酸含量，说明此处理方式有利于促进 N 同化。

在本研究中，接种 AMF 显著增加白三叶叶片 NR 和 NiR 活性，而接种根瘤菌对 NR 和 NiR 活性并无影响，表明 AMF 接种有利于白三叶由 NO_3^-向 NH_4^+转变，这与前人在苜蓿上的研究一致（田超等，2020）。此外，联合接种根瘤菌和 AMF 的处理进一步增强了单一接种 AMF 对 NR 和 NiR 活性的刺激效果，表明了两种微生物协同地增强了菌根植物叶片 NO_3^-向 NH_4^+转变速率。单一或联合接种根瘤菌和 AMF 均提高了白三叶叶片 GOGAT、GDH、GS 活性，这些说明单一或联合接种根瘤菌和 AMF 通过调控 GS/GOGAT 和 GDH 途径中的酶活性不同程度地促进 N 同化合成氨基酸，其中联合接种的作用效果更明显，而接种根瘤菌在促进 NH_4^+转化为 Gln 上比接种 AMF 效果显著。在本研究中单一和联合接种根瘤菌和 AMF 均显著促进白三叶叶片 AS 和 AST 活性，从而促进 Asn 和 Asp 的积累。这些表明了联合接种 AMF 和根瘤菌有效地激活了 N 同化相关酶的活性，提升了生成氨基酸含量。

3.2 结论

联合接种 AMF 和根瘤菌具有协同效应，有效促进白三叶的植株生长、显著提高植株光合作用水平、叶片 N 含量，同时显著增加了白三叶叶片中丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸和组氨酸的含量，显著提升了叶片 N 同化相关酶，如硝酸还原酶、亚硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶、谷氨酸合成酶、谷氨酸脱氢酶、天冬酰胺合成酶和天冬氨酸转氨酶的活性，且显著促进 AMF 对白三叶根系的侵染。说明了 AMF 和根瘤菌的协同作用下有效促进了白三叶 N 同化。

参考文献：

BLILOU I, OCAMPO JA, GARCíA-GARRIDO JM, 1999. Resistance of pea roots to endomycorrhiza fungus or *Rhizobium* correlates with enhanced levels of endogenous salicylic acid[J]. J Exp Bot, 50(340): 1663-1668.

CERVILLA LM, BLASCO B, RIOS JJ, et al., 2009. Response of nitrogen metabolism to boron toxicity in tomato plants[J]. Plant Biology, 11(5): 671-677.

DIAO YN, ZHAO LM, JIN HR, et al., 2014. Growth and physical indexes of leguminous plant inoculated with AM and rhizobium under Cd stress[J]. Guizhou Agric Sci, 42(12): 74-78. [刁亚南，赵腊梅，金海如，2014. 镉胁迫下豆科植物接种 AM 真菌和根瘤菌的生长及生理指标变化[J]. 贵州农业科学，42(12)：74−78.]

HIREL B, GADAL P, 1980. Glutamine synthetase in rice: a comparative study of the enzymes from roots and leaves[J]. Plant Physiol, 66(4): 619-623.

HODGES M, 2002. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation[J]. J Exp Bot, 53(370): 905-916.

HUANG XH, WU JJ, WANG YS, et al., 2022. Growth and chlorophyll fluorescence characteristics of walnut (*Juglans regia*) seedling under different nitrogen supply levels[J]. J Nanjing For Univ (Nat

Sci), 46(2): 119-126. [黄小辉，吴焦焦，王玉书，等，2022. 不同供氮水平的核桃幼苗生长及叶绿素荧光特性[J]. 南京林业大学学报(自然科学版)，46(2)：119–126.]
HUSTED S, MATTSSON M, MOLLERS C, et al., 2002. Photorespiratory NH_4^+ production in leaves of wild-type and glutamine synthetase 2 antisense oilseed rape[J]. Plant Physiol, 130(2): 989-998.
JIN HR, 2008. Arbuscular mycorrhizal hyphae arginine two-way run and decomposition of ornithine[J]. Sci China Ser C, 38(11): 1048-1055. [金海如，2008. 丛枝菌根菌丝精氨酸双向运转并分解为鸟氨酸[J]. 中国科学：C 辑，38(11)：1048–1055.]
LIANG CG, ZHANG Q, LI J, et al., 2013. Effect of high temperature on aspartate metabolism enzyme activities and aspartate-family amino acids contents at rice grain-filling stage[J]. Chin J Rice Sci, 27(1): 71-76. [梁成刚，张青，李敬，等，2013. 水稻灌浆期高温对天冬氨酸代谢酶活性及其家族氨基酸含量的影响[J]. 中国水稻科学，27(1)：71–76.]
LIU CY, ZHANG F, ZHANG DJ, et al., 2020. Transcriptome analysis reveals improved root hair growth in trifoliate orange seedlings by arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Plant Growth Regul, 92(5): 195-203.
LIU SY, DONG ST, ZHAO BQ, et al., 2007. Effects of long-term fertilization on activities of key enzymes related to nitrogen metabolism (ENM) of maize leaf[J]. Acta Agron Sin, 33(2): 278-283. [刘淑云，董树亭，赵秉强，等，2007. 长期施肥对夏玉米叶片氮代谢关键酶活性的影响[J]. 作物学报，33(2)：278–283.]
LIYANAARACHCHI GVV, MAHANAMA KRR, SOMASIRI HPPS, et al., 2018. Development and validation of a method for direct, underivatized analysis of free amino acids in rice using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 1568(9): 131-139.
MASSON-BOIVIN C, SACHS JL, 2018. Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia—the roots of a success story[J]. Curr Opin Plant Biol, 44(8): 7-15.
OGAWA T, FUKUOKA H, YANO H, et al., 1999. Relationships between nitrite reductase activity and genotype-dependent callus growth in rice cell cultures[J]. Plant Cell Rep, 18(7): 576-581.
PHILLIPS JM, HAYMAN DS, 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans Br Mycol Soc, 55(1): 158-161.
REN CG, KONG CC, WANG SX, et al., 2019. Enhanced phytoremediation of uranium-contaminated soils by arbuscular mycorrhiza and rhizobium[J]. Chemosphere, 217: 773-779.
SAXENA AK, RATHI SK, TILAK KVBR, 1997. Differential effect of various endomycorrhizal fungi on nodulating ability of green gram by *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) strain S24[J]. Biol Fert Soils, 24(2): 175-178.
SERRALTA-INTERIAN AA, MIRANDA-HAM M, ECHEVARRIA-MACHADO I, 2020. Stimulation of root growth and enhanced nitrogenous metabolite content in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) treated with a D-amino acid mixture[J]. Theor Exp Plant Physiol, 32(1): 31-47.
SHIDRIN S, PARROTT CL, 1974. In vitro assembly of L-asparaginase subunits[J]. J Biol Chem, 249(13): 4175-4180.
SINGH RP, SRIVASTAVA HS, 1986. Increase in glutamate synthase (NADH) activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen[J]. Physiol Plant, 66(3): 413-416.
TALAAT NB, ABDALLAH AM, 2008. Response of faba bean (*Vicia fava* L.) to dual inoculation with *Rhizobium* and VA mycorrhiza under different levels of N and P fertilization[J]. J Appl Sci Res, 4(9): 1092-1102.

TIAN C, LI Q, XU QF, et al., 2020. Effects of AMF and rhizobium inoculation on the nitrogen and phosphorus of alfalfa and soil in mining areas[J]. J Shanxi Agric Sci, 48(4): 580-583. [田超，李倩，许庆芳，等，2020. 矿区土接种 AMF 和根瘤菌对紫花苜蓿及土壤氮磷的影响[J]. 山西农业科学，48(4)：580−583.]

WANG XK, 2016. Principles and techniques of plant physiological biochemical experiment[M]. Beijing: Higher Education Press: 134-136. [王学奎，2016. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京：高等教育出版社：134−136.]

XAVIER LJC, GERMIDA JJ, 2003. Selective interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium leguminosarum* bv. viceae enhance pea yield and nutrition[J]. Biol Fert Soils, 37(5): 261-267.

XIE K, REN Y, CHEN A, et al., 2022. Plant nitrogen nutrition: The roles of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. J Plant Physiol, 269: 153591.

XIE MM, ZOU YN, WU QS, et al., 2020. Single or dual inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia regulates plant growth and nitrogen acquisition in white clover[J]. Plant Soil Environ, 66(6): 287-294.

XUE YB, 2018. Transcriptomics analysis of soybean nodules responsive to phosphorus deficiency and GmSPX5 functions in regulating nodule growth[D].Guangzhou: S China Agric Univ: 36-97. [薛迎斌，2018. 大豆根瘤缺磷响应基因的表达谱及 GmSPX5 调控根瘤生长的研究[D]. 广州：华南农业大学：36−97.]

YANG HQ, GAO HJ, 2007. Physiological function of arginine and its metabolites in plants[J]. J Plant Physiol Mol Biol, 33(1): 1-8. [杨洪强，高华军，2007. 植物精氨酸及其代谢产物的生理功能[J]. 植物生理与分子生物学学报，33(1)：1−8.]

ZHANG L, YANG CX, 2018. Enzyme activities and free amino acids of puccinellia tenuiflora-arbuscular mycorrhizal symbiont under saline alkali stress[J]. J Northeast For Univ, 46(11): 91-96. [张良，杨春雪，2018. 盐碱胁迫对星星草−丛枝菌根真菌共生体酶活性及游离氨基酸的影响[J]. 东北林业大学学报，46(11)：91−96.]

ZHAO GQ, WANG SM, REN JZ, et al., 2004. Research progress on genetic transformation and ecological adaptability in white clover[J]. Acta Ecol Sin, 24(3): 592-598. [赵桂琴，王锁民，任继周，2004. 白三叶转基因及其生态适应性研究进展[J].生态学报，24(3)：592−598.]